

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

04.11.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

2003年10月24日

REC'D 23 DEC 2004

出願番号
Application Number:

特願2003-364013

WIPO

PCT

[ST. 10/C]: [JP2003-364013]

出願人
Applicant(s):

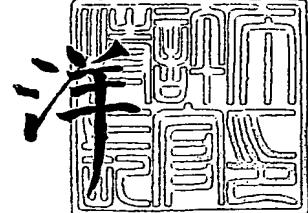
ヤマサ醤油株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川

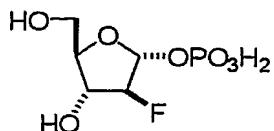


【書類名】 特許願
【整理番号】 YP2003-010
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07H 1/00
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県銚子市栄町 2-2-2
【氏名】 山田 浩平
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県銚子市新生町 2-2-1
【氏名】 松本 倫毅
【発明者】
【住所又は居所】 千葉県銚子市清川町 4-8-8
【氏名】 早川 弘之
【特許出願人】
【識別番号】 000006770
【住所又は居所】 千葉県銚子市新生町 2 丁目 10 番地の 1
【氏名又は名称】 ヤマサ醤油株式会社
【代表者】 濱口 道雄
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 056030
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項1】

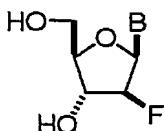
式(I)で示される α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシド又はその塩。



(I)

【請求項2】

ヌクレオシドホスホリラーゼを用い、請求項1記載の α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドもしくは1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドの α 、 β 混合物と塩基(B)から式(II)で示される2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノヌクレオシドを合成することを特徴とする、2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノヌクレオシドの製造法。



(II)

(式中、Bは塩基を示す。)

【請求項3】

Bがプリン又はその誘導体である、請求項2記載の製造法。

【請求項4】

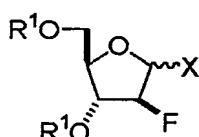
Bが、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、または2, 6-ジアミノプリンである、請求項2記載の製造法。

【請求項5】

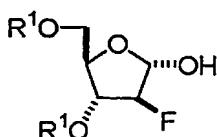
ヌクレオシドホスホリラーゼが、プリンヌクレオシドホスホリラーゼである、請求項2記載の製造法。

【請求項6】

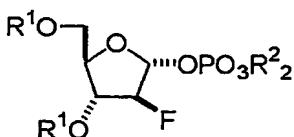
式(III)で示される2-デオキシ-2-フルオロアラビノース誘導体の1位を加水分解して式(IV)で示される α -1-ヒドロキシル体を立体選択的に得、1位水酸基をリン酸化して式(V)で示される α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシド誘導体とし、水酸基およびリン酸基の保護基を脱保護して請求項1記載の α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドを合成することを特徴とする、立体選択的な α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドの製造法。



(III)



(IV)

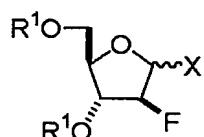


(V)

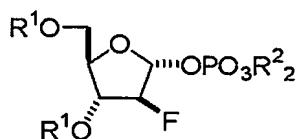
(式中、R₁は水酸基の保護基、Xは脱離基、R₂は水素またはアルキル基を示す。)

【請求項7】

式(I I I)で示される2-デオキシー2-フルオロアラビノース誘導体を、塩基存在下、リン酸化剤で処理して、式(V)で示される α -1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシド誘導体と該誘導体の β 体との混合物を得、水酸基およびリン酸基の保護基を脱保護して請求項1記載の α -1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシドとその β 体との混合物を合成することを特徴とする、1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシドの製造法。



(I I I)



(V)

(式中、R₁は水酸基の保護基、Xは脱離基、R₂は水素またはアルキル基を示す。)

【請求項8】

請求項7記載の製法において、強酸塩の存在下、リン酸化剤処理する、請求項7記載の製造法。

【請求項9】

強酸塩が、ハロゲンイオンや硝酸イオンを発生する強酸塩である、請求項8記載の製造法。

【書類名】明細書

【発明の名称】 α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシド及び2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノヌクレオシドの製造法

【技術分野】

【0001】

本発明は、 α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドおよびこれを鍵中間体とした2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノヌクレオシドの製造法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年、2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノヌクレオシド(2'-F-A NA)を構成成分とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが、その生物的活性のために大いに注目されている(Biochemistry, 41, 3457(2002)、Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, 2651, (2002)、WO 99/67378)。

【0003】

2'-F-A NAは既知化合物であり、その化学的合成法も既に報告されている(J. Org. Chem., 50, 3644(1985)、J. Org. Chem., 53, 85(1988)、特公平7-23395号公報)。具体的には、2'-F-A NAを天然のヌクレオシドから誘導することは困難であるため、1-ハロゲン化糖誘導体と核酸塩基との置換反応(結合反応)により合成されている。しかし、反応液中には α 、 β の異性体が混在し、高純度な2'-F-A NAを得るには煩雑なカラムクロマトグラフィーなどの精製処理を必要とした。

【0004】

その中でも、2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノピリミジンヌクレオシドは、比較的容易に合成可能であるものの、2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノプリンヌクレオシドは、反応液中に複雑な異性体(α 体、 β 体、7位体、9位体など)が混在し、2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノプリンヌクレオシドの効率的な合成法は未だに確立されていないのが現状である。

【0005】

上記化学合成法の欠点を克服する手段の1つとして、酵素合成法が考えられている。たとえば、2-デオキシリボースの1位リン酸化糖の異性化反応の平衡を傾かせて α -1-リン酸化糖誘導体を合成し、引き続きヌクレオシドホスホリラーゼを用いて目的とするヌクレオシドを製造法が報告されている(特開2002-205996号公報)。

【0006】

しかし、本発明者らの知見によると、1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドは比較的安定であり、異性化反応の平衡を α 体の方向へ傾けることは困難であるため、2'-F-A NAの製造に上記酵素法を適用することはできない。

【0007】

また、2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノピリミジンヌクレオシドとプリン塩基からヌクレオシドホスホリラーゼを用いて2'-デオキシ-2'-フルオロ- β -D-アラビノプリンヌクレオシドを酵素合成する方法も報告されている(特開昭63-258891号公報)。

【0008】

【特許文献1】特開2002-205996号公報

【特許文献2】特開昭63-258891号公報

【特許文献3】WO 99/67378

【特許文献4】特公平7-23395号公報

【非特許文献1】Biochemistry, 41, 3457(2002)

【非特許文献2】Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, 2651, (2002)

【非特許文献3】J. Org. Chem., 50, 3644(1985)

【非特許文献4】J. Org. Chem., 53, 85(1988)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

しかしながら、上記酵素法は、(1) 化学的に合成した高価な2' - デオキシ-2' - フルオロ- β -D-アラビノピリミジンヌクレオシドを原料として用いていること、(2) 目的物の2' - F-ANAの合成収率が悪いこと(対塩基収率は15%未満である)、(3) 2種類のヌクレオシドホスホリラーゼを使用する必要があることなど、必ずしも満足できる方法ではなかった。

【0010】

なお、上記方法が低収率である原因は、ヌクレオシドホスホリラーゼを用いた2' - デオキシ-2' - フルオロ- β -D-アラビノピリミジンヌクレオシドの加リン酸分解反応の効率の低さに起因しているものと考えられる。

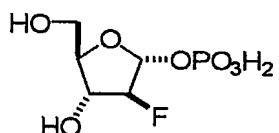
【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記酵素法をより実用的なものとすべく鋭意検討を重ねた結果、(1) 1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドは、従来考えられていたより水溶液中で安定であり、その α 体はヌクレオシドホスホリラーゼの基質として十分利用可能であること、(2) α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドを選択的に合成する方法を見出したこと、(3) β 体はヌクレオシドホスホリラーゼの基質とならないため、より簡便な方法で α β の混合物を合成しても、 α 体の比率を高めることで結果的に収率良く2' - F-ANAを合成できること、(4) 原料として2' - デオキシ-2' - フルオロ- β -D-アラビノピリミジンヌクレオシドではなく、1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドを用いるため、2種類のヌクレオシドホスホリラーゼを使用する必要がないこと等を見出し、本発明を完成させた。

【0012】

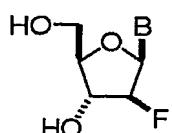
すなわち、本発明は、式(I)で示される α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシド又はその塩に関するものである。



(I)

【0013】

また、本発明は、ヌクレオシドホスホリラーゼを用い、上記 α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドもしくは1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドの α β 混合物と塩基(B)から式(I I)で示される2' - デオキシ-2' - フルオロ- β -D-アラビノヌクレオシドを合成することを特徴とする、2' - デオキシ-2' - フルオロ- β -D-アラビノヌクレオシドの製造法に関するものである。



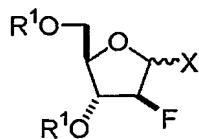
(I I)

(式中、Bは塩基を示す。)

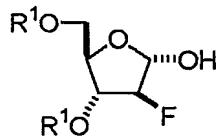
【0014】

さらに本発明は、式(I I I)で示される2-デオキシ-2-フルオロアラビノース誘導体の1位を加水分解して式(I V)で示される α -1-ヒドロキシル体を立体選択的に得、1位水酸基をリン酸化して式(V)で示される α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシド誘導体とし、水酸基およびリン酸基の保護基を脱保護して上記 α -

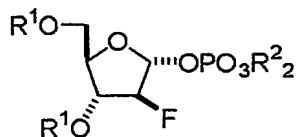
1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシドを合成することを特徴とする、立体選択的な α -1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシドの製造法に関するものである。



(III)



(IV)

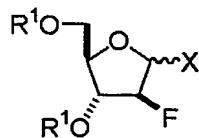


(V)

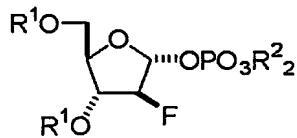
(式中、R1は水酸基の保護基、Xは脱離基、R2は水素あるいはアルキル基を示す。)

【0015】

さらにまた、本発明は、式(III)で示される2-デオキシー2-フルオロアラビノース誘導体を、塩基存在下、リン酸化剤で処理して、式(V)で示される α -1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシド誘導体と該誘導体の β 体との混合物を得、水酸基およびリン酸基の保護基を脱保護して請求項1記載の α -1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシドとその β 体との混合物を合成することを特徴とする、1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシドの製造法に関し、好ましくは、添加剤として強酸塩の共存下、リン酸化剤処理することに関するものである。



(III)



(V)

(式中、R1は水酸基の保護基、Xは脱離基、R2は水素あるいはアルキル基を示す。)

【発明の効果】

【0016】

本発明により、これまで立体選択的に調製すること、あるいは収率良く調製することが困難であった2'-F-ANA、特に2'-デオキシー2'-フルオロ- β -D-アラビノプリンヌクレオシドを、簡便な方法で収率良く工業的なスケールでの製造することが可能となり、2'-F-ANAを構成成分とするアンチセンス医薬品の開発促進が大いに期待できるものである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

最初に、本発明は、上記式(I)で示される α -1-リン酸化2-デオキシー2-フルオロアラビノシド又はその塩に関するものである。

【0018】

塩としては特に制限されるものでなく、例えばアルカリ金属塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）；アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等）；有機塩基塩（例えばトリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシリルアミン塩等）、アンモニウム塩等が挙げられる。

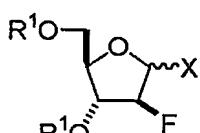
【0019】

このような α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドは、本発明者が開発した2つの方法で合成することができる。

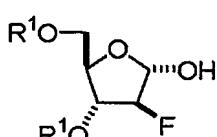
【0020】

合成法1：

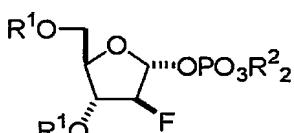
式(I II)で示される2-デオキシ-2-フルオロアラビノース誘導体の1位を加水分解して式(IV)で示される α -1-ヒドロキシリル体を立体選択的に得、1位水酸基をリン酸化して式(V)で示される α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシド誘導体とし、水酸基およびリン酸基の保護基を脱保護して上記 α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドを合成する。



(I II)



(IV)



(V)

【0021】

上記式中、R1の水酸基の保護基としては、アセチル、ベンゾイルなどのアシリル基、ベンジル、p-メトキシベンジルなどのアルキル基、またはt-ブチルジメチルシリル、t-ブチルジフェニルシリルなどのシリル基を例示することができる。

【0022】

また、Xの脱離基としては、プロモ、ヨード等のハロゲン原子、アシリル基、メシリル基、トリル基、トリフルオロメタンスルホニル基などを例示することができ、特にハロゲン原子が好適である。

【0023】

さらに、R2のアルキル基としては、メチル、エチル、アリル、2-シアノエチル、2-トリメチルシリルエチル、ベンジルなどのリン酸の保護基として通常使用されているアルキル基を例示することができる。

【0024】

出発原料である式(I II)で示される2-デオキシ-2-フルオロアラビノース誘導体は公知化合物であり、公知の方法(J. Org. Chem., 50, 3644(1985)、J. Org. Chem., 53, 85(1988)、特公平7-23395号公報)に準じて調製することができる。

【0025】

式(I II)化合物1位の加水分解反応は、アセトニトリル、DMF、メタノール、THFなどの有機溶媒中、トリプチルアミン、トリエチルアミンなどの塩基存在下、式(I II)化合物1モルに対し、1モル以上の塩基と水を使用し、反応温度0~100℃で1

～24時間程度、必要により攪拌しながら反応させることで実施することができる。

【0026】

このようにして調製した式（IV）化合物は、必要により通常の糖の精製手段（有機溶媒による分配、各種クロマトグラフィー処理）により精製し、次のリン酸化反応に供する。

【0027】

式（IV）化合物1位のリン酸化反応は、公知の方法に準じて行えばよく、たとえば、五価のリン酸化剤を用いてリン酸化するか、三価のリン酸剤を用いて亜リン酸化した後、酸化することで実施できる。

【0028】

より具体的に五価のリン酸化剤を用いる方法としては、アセトニトリル、THF、ジクロロメタンなどの有機溶媒中、トリプチルアミン、トリエチルアミン、ピリジンなどの塩基存在下、オキシ塩化リン、モノアルキルホスホリルハライド、ジアルキルホスホリルハライドなどのリン酸化剤を式（IV）化合物1モルに対して1～10モル使用し、反応温度－78～120℃で1～24時間程度反応させることにより実施することができる。

【0029】

また、三価のリン酸化剤を用いる方法としては、アセトニトリル、THF、ジクロロメタン、1,4-ジオキサンなどの有機溶媒中、トリプチルアミン、トリエチルアミン、ピリジンなどの塩基存在下、三塩化リン、クロロホスホジアミダイトなどの亜リン酸化剤を反応させ、次いで、シアノエタノール、アリルアルコールなどのアルコール類と反応させホスファイトとし、これを、m-クロロ過安息香酸、t-ブチルペルオキシド、過酸化水素等の酸化剤を用いて酸化することにより実施することができる。リン酸化剤、アルコール類および酸化剤は式（IV）化合物1モルに対して1～10モル使用し、反応温度－78～120℃で1～24時間程度反応させればよい。

【0030】

このようにして得られた式（V）化合物は、必要により通常の糖の精製手段（有機溶媒による分配、各種クロマトグラフィー処理）により精製し、次の脱保護反応に供する。

【0031】

式（V）化合物の水酸基及びリン酸エステル部の保護基の除去は、使用した保護基に応じて酸処理、アルカリ処理、接触還元、フッ化アンモニウム処理など、通常使用する方法を選択して行えばよい。

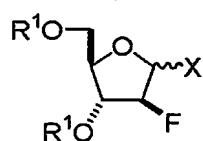
【0032】

このようにして調製した式（I）化合物は、必要により通常の糖の精製手段（有機溶媒による分配、各種クロマトグラフィー処理、結晶化など）により精製し、次の酵素反応に供する。

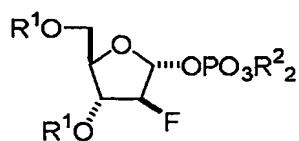
【0033】

合成法2：

式（III）化合物を、塩基存在下、リン酸化剤で処理して、式（V）化合物と該化合物の β 体との混合物を得、水酸基およびリン酸基の保護基を脱保護して式（I）化合物とその β 体との混合物を合成する。



(III)



(V)

【0034】

リン酸化反応は、アセトニトリル、ジクロロメタン、DMF、メチルエチルケトンなどの有機溶媒中、トリブチルアミン、トリエチルアミンなどの塩基存在下、正リン酸、リン酸モノエステル、リン酸ジエ斯特ルなどのリン酸誘導体を式（III）化合物1モルに対して、いずれも1モル以上使用し、反応温度は-78～120℃で、1～24時間程度反応させることにより実施できる。

【0035】

リン酸化反応の際、添加剤として強酸塩、具体的にはハロゲンイオンや硝酸イオンを発生する強酸塩（より具体的には、テトラブチルアンモニウムヨージド、硝酸テトラブチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウムクロリド、ヨウ化ナトリウムなどのハロゲンイオンや硝酸イオンのアンモニウム塩または金属塩）を式（III）化合物1モルに対して、0.1～20モル程度添加することで、 β 体よりも α 体を優位に合成することが可能である。得られた式（V）化合物は、必要により通常の糖の精製手段（有機溶媒による分配、各種クロマトグラフィー処理）により精製し、次の脱保護反応に供する。

【0036】

式（V）化合物の水酸基及びリン酸エ斯特ル部の保護基の除去は、使用した保護基に応じて酸処理、アルカリ処理、接触還元、フッ化アンモニウム処理など、通常使用する方法を適宜選択して行えばよい。

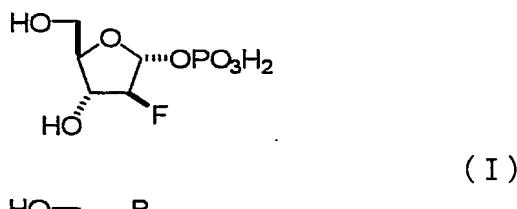
【0037】

このようにして調製した式（I）化合物は、必要により通常の糖の精製手段（有機溶媒による分配、各種クロマトグラフィー処理、結晶化など）により精製し、次の酵素反応に供する。

【0038】

酵素反応；

このようにして得られた式（I）化合物あるいは α β 混合物と塩基（B）から、ヌクレオシドホスホリラーゼを用い、式（II）で示される2'F-ANAを合成する。



【0039】

反応に用いるヌクレオシドホスホリラーゼとしては、式（II）化合物を合成できるものであれば特に制限されるものではないが、特にプリンヌクレオシドホスホリラーゼが使用に好ましい。また、ヌクレオシドホスホリラーゼは特定の由来のものに限定されず、動物由来、植物由来、微生物由来など、すべての由来のものを使用することができるが、酵素調製の簡便性などの点から微生物由来のヌクレオシドホスホリラーゼを使用するのが好ましい。また、使用するヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子がクローン化されている場合には、そのクローン化されたヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子を用いて常法により大腸菌などを宿主として大量生産させ、当該組換え菌より当該酵素を調製することも可能である。

【0040】

このようなヌクレオシドホスホリラーゼは、当該活性を有する限りどのような形態であってもよい。具体的には、微生物の菌体、該菌体の処理物または該処理物から得られる酵素調製物などが挙げられる。

【0041】

微生物の菌体の調製は、当該微生物が生育可能な培地を用い、常法により培養後、遠心分離等で集菌する方法で行うことができる。具体的に、バシラス属または大腸菌類に属する細菌を例に挙げ説明すれば、培地としてはブイヨン培地、LB培地（1%トリプトン、0.5%イーストエキストラクト、1%食塩）または2xYT培地（1.6%トリプトン、1%イーストエキストラクト、0.5%食塩）などを使用することができ、当該培地に種菌を接種後、約30～50℃で約10～50時間程度必要により攪拌しながら培養し、得られた培養液を遠心分離して微生物菌体を集菌することによりヌクレオシドホスホリラーゼ活性を有する微生物菌体を調製することができる。

【0042】

微生物の菌体処理物としては、上記微生物菌体を機械的破壊（ワーリングブレンダー、フレンチプレス、ホモジナイザー、乳鉢などによる）、凍結融解、自己消火、乾燥（凍結乾燥、風乾などによる）、酵素処理（リゾチームなどによる）、超音波処理、化学処理（酸、アルカリ処理などによる）などの一般的な処理法に従って処理して得られる菌体の破壊物または菌体の細胞壁もしくは細胞膜の変性物が挙げられる。

【0043】

酵素調製物としては、上記菌体処理物からヌクレオシドホスホリラーゼ活性を有する画分を通常の酵素の精製手段、例えば塩析処理、等電点沈澱処理、有機溶媒沈澱処理、透析処理、各種クロマトグラフィー処理などを施して得られる粗酵素または精製酵素を使用することができる。

【0044】

反応液に添加する塩基（B）は、合成目的に応じて市販されているもの、あるいは公知の方法で調製したもの等を使用すればよい。

【0045】

具体的には、核酸に含まれるピリミジン塩基またはプリン塩基、より具体的には、ピリミジン塩基としては、4-アミノ-ピリミジン-2-オン（シトシン）、4-ヒドロキシ-5-メチル-ピリミジン-2-オン（チミン）、4-ヒドロキシ-ピリミジン-2-オン（ウラシル）等が挙げられ、プリン塩基としては、6-アミノプリン（アデニン）、2-アミノ-6-ヒドロキシプリン（グアニン）、2, 6-ジヒドロキシプリン（キサンチン）、6-ヒドロキシプリン（ヒポキサンチン）、2, 6-ジアミノプリン等が挙げられる。

【0046】

また、本発明において、反応に使用できる塩基は上記のものに限定されるものでなく、たとえば、ピリミジン環またはプリン環に置換しているアミノ基、ヒドロキシ基およびメチル基の一部または全部を水素原子に置換したものまたはこれに置換基を有するもの；ピリミジン環またはプリン環内の窒素原子の一部を炭素原子に置換したデアザ体またはこれに置換基を有するもの；ピリミジン環またはプリン環内の炭素原子の一部を窒素原子に置換したアザ体またはこれに置換基を有する誘導体も包含する。具体的に、置換基としては、ハロゲン原子、アルキル基、ハロアルキル基、アルケニル基、ハロアルケニル基、アルキニル基、アミノ基、アルキルアミノ基、水酸基、ヒドロキシアミノ基、アミノキシ基、アルコキシ基、メルカプト基、アルキルメルカプト基、アリール基、アリールオキシ基、シアノ基などが挙げられ、置換基の数及び位置は特に制限されるものではない。

【0047】

本発明の2'F-ANAの合成反応は、式（I）化合物あるいは $\alpha\beta$ 混合物と塩基（B）を約1～200mM、好ましくは10～100mM用い、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液等の各種緩衝液中、ヌクレオシドホスホリラーゼを約5ユニット/mL以上、好ましくは約50ユニット/mL添加し、20℃～70℃、好ましくは40℃～60℃で約1～100時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施できる。なお、式（I）化合物に対する塩基（B）の使用量は、1当量以上、好ましくは約2～5モル倍当量程度使用するのが好ましい。

【0048】

本発明においては、上記酵素反応終了後、各種酵素を用いて得られたヌクレオシド化合物を修飾しても良く、たとえば、アデノシンデアミナーゼを用いた脱アミノ反応は、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液等の各種緩衝液中、アデノシンデアミナーゼを約5ユニット/m^l以上、好ましくは約30ユニット/m^l添加し、20～70℃で約1～100時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施できる。

【0049】

このようにして得られた2'F-ANAは、ヌクレオシドの通常の単離精製手段（イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、結晶化など）により単離精製することができる。

【実施例】

【0050】

以下に、本発明を合成例により更に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例の範囲のみに限定されるものではない。

【0051】

合成例1：3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート [式V；R¹=Bz, R²=H]

リン酸（5.0 g, 51 mmol）、モレキュラーシーブス4A（3.6 g）をアセトニトリル（18 mL）に懸濁し、0℃でトリ-n-ブチルアミン（24.3 mL, 102 mmol）加え室温で1時間攪拌した。室温でテトラ-n-ブチルアンモニウムヨージド（15.7 g, 42.5 mmol）を加え、さらに10分後、3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ブロミド [式III；R¹=Bz, X=Br]（3.59 g, 8.5 mmol）のアセトニトリル溶液（36 mL）を滴下した。室温で2時間攪拌した後、不溶物をろ過して除いた。ろ液を減圧下で濃縮し、残さを酢酸エチル（150 mL）で抽出した。有機層を0.1N塩酸で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した（HPLC分析：1-リン酸誘導体60.3%， α/β =3.4）。

【0052】

残さをメチルエチルケトン（90 mL）に溶解し、リン酸（13.3 g）、モレキュラーシーブス4A（3.6 g）を加え80℃で2時間攪拌した。不溶物をろ過して除去した後、溶媒を留去した。残さを酢酸エチル（150 mL）で抽出した。有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した（HPLC分析：1-リン酸誘導体60.5%， α/β =4.9）。

【0053】

さらに、残さを逆相ODSカラムクロマトグラフィー（600 mL, 5%～40%アセトニトリル水）にて精製し、目的とする3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェートを β -アノマーとの混合物（³¹P-NMR分析： α/β =5.7）として2.91 g（41%）得た（ただし、目的物1モルに対し0.6モルのトリ-n-ブチルアンモニウム、および0.1モルのテトラ-n-ブチルアンモニウムを含有する）。

【0054】

¹H-NMR (CDCl₃) : δ 8.07-8.02 (4H, m), 7.51-7.36 (6H, m), 5.99 (1H, dd, J=5.6 and 8.6 Hz), 5.46 (1H, dd, J=4.3 and 22.9 Hz), 5.30 (1H, d, J=49.1 Hz), 4.74-4.57 (3H, m)

【0055】

合成例2：3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート [式V；R¹=Bz, R²=H]

1.0Mのリン酸/トリ-n-ブチルアミンのアセトニトリル溶液（0.75 mL）にモレキュラーシーブス4A（50 mg）、および以下のTableに示す添加剤（各0.

6 mmol) を加え室温で40分間攪拌した。これに3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ブロミド [式III; R¹=Bz, X=Br] (5.0 mg, 0.12 mmol) のアセトニトリル溶液 (0.5 mL) を滴下した。

【0056】

リン酸化反応をHPLC [UV: 230 nm, 分析カラム: SHISEIDO CAP CELL PAK NH₂ (4.6 mmI.D. × 250 mm), カラム温度: 30°C, 移動相: 60 mM KH₂PO₄ (50%) - アセトニトリル (50%), pH 4.0 (H₃PO₄), 流速: 1.0 mL/min] にて分析し、面積%より1-リン酸誘導体の生成率および α / β 比を算出した。なお、保持時間は α -アノマーが3.8分、 β -アノマーが4.4分であった。

【0057】

その結果を表1に示す。表1から明らかなように、添加剤の添加により、 α -アノマーの割合が高くなることが明らかとなった。

【0058】

【表1】

添加剤	反応温度	1-リン酸誘導体	α/β 比
なし	室温	75%	0.6
テトラ-n-ブチルアンモニウムヨージド	室温	69%	2.4
テトラ-n-ブチルアンモニウム硝酸	室温	65%	2.6
テトラ-n-エチルアンモニウムクロリド	70°C	65%	1.9

【0059】

合成例3: 3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノース [式IV; R¹=Bz]

3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ブロミド [式III; R¹=Bz, X=Br] (2.40 g, 5.7 mmol) をDMF (50 mL) に溶解し、トリエチルアミン (4.8 mL, 34.2 mmol)、水 (3.1 mL, 17.1 mmol) を加え、室温で30分間攪拌した。減圧下で溶媒を留去し、残さを酢酸エチルで抽出し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水、および飽和食塩水で洗浄した。さらに無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (150 g, 0%~5%メタノール-クロロホルム) にて精製し、目的物を1.85 g (90%) 得た。

【0060】

¹H-NMR (CDCl₃): δ 8.08-8.01 (4H, m), 7.63-7.41 (6H, m), 5.70 (1H, dd, J=3.6 and 10.2 Hz), 5.50 (1H, dd, J=4.3 and 22.0 Hz), 5.18 (1H, d, J=49.1 Hz), 4.77-4.60 (3H, m), 2.89 (1H, t, J=3.4 Hz)

【0061】

合成例4: 3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-(ビス-2-シアノエチル) ホスフェート [式V; R¹=Bz, R²=CH₂CH₂CN]

3, 5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノース [IV; R¹=Bz] (1.01 g, 2.8 mmol) をアセトニトリルで2回共沸脱水した後、アセトニトリル (20 mL) に溶解し、トリエチルアミン (1.2 mL, 8.4 mmol)、およびビス(ジイソプロピルアミノ)クロロホスフィン (1.69 g, 5.6 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。

【0062】

これに2-シアノエタノール (1.9 mL, 28 mmol)、および1H-テトラゾ-

ル（0.98 g, 14 mmol）を加え室温で1.5時間攪拌した。さらに70% t-ブチルヒドロペルオキシド溶液（2.5 mL）を加え、室温で30分間攪拌した。酢酸エチル（100 mL）で抽出し、有機層を水で2回、チオ硫酸ナトリウム水、飽和炭酸水素ナトリウム水、および飽和食塩水でそれぞれ1回ずつ洗浄した。

【0063】

無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下で溶媒を留去した。残さをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（70 g, 50%~100%酢酸エチル-n-ヘキサン）にて精製し、目的物を0.78 g (51%) 得た。

【0064】

¹H-NMR (CDCl₃) : δ 8.07-8.05 (4H, m), 7.65-7.43 (6H, m), 6.14 (1H, dd, J=4.2 and 8.3 Hz), 5.56 (1H, dd, J=3.9 and 20.9 Hz), 5.34 (1H, d, J=48.4 Hz), 4.82 (1H, q, J=3.9 Hz), 4.78 (1H, dd, J=3.5 and 12.2 Hz), 4.68 (1H, dd, J=4.6 and 12.2 Hz), 4.37-4.27 (4H, m), 2.78-2.68 (4H, m)

【0065】

合成例5：3,5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート [式V; R¹=Bz, R²=H]

3,5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-（ビス-2-シアノエチル）ホスフェート [式V; R¹=Bz, R²=CH₂CH₂CN] (85 mg, 0.16 mmol) を塩化メチレン（3 mL）に溶解し、DBU (0.25 mL, 1.6 mmol) を加え、室温で10分間攪拌した。これにクロロトリメチルシラン（0.1 mL, 0.8 mmol）を加え、室温で1時間攪拌した。反応液をクロロホルムで抽出し、有機層を0.1 N 塩酸で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。残さを酢酸エチル（0.5 mL）に溶解し、これにn-ヘキサン（5 mL）を滴下して加えた。上澄液を除去し、残さを真空乾燥して目的物を71 mg (89%) 得た（ただし、目的物1モルに対し0.4モルのDBUを含有する）。

【0066】

¹H-NMR (CDCl₃) : δ 8.07-8.02 (4H, m), 7.51-7.36 (6H, m), 5.99 (1H, dd, J=5.6 and 8.6 Hz), 5.46 (1H, dd, J=4.3 and 22.9 Hz), 5.30 (1H, d, J=49.1 Hz), 4.74-4.57 (3H, m)

【0067】

合成例6：2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート [式I]

合成例1で合成した3,5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート [式V; R¹=Bz, R²=H] (2.8 g, α -アノマーとして3.38 mmol) をメタノール（70 mL）に溶解し、28%アンモニア水（70 mL）を加え、室温で1.5時間攪拌した。さらに28%アンモニア水（70 mL）を加え、室温で一晩攪拌した。

【0068】

減圧下で溶媒を留去し、残さを水（50 mL）に溶解した。これを酢酸エチル（100 mL）で2回洗浄し、水層を回収した。減圧下で水を濃縮し、メンブランフィルター（PTFE, 0.45 mm）でろ過後、ろ液を濃縮した。残さにアセトン（10 mL, 2回）を加え、上澄液を除去した。残さをエタノールで2回共沸し、減圧下、50℃で2時間乾燥して粗2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート [式I] を1.36 g 得た。

【0069】

¹H-NMR (D₂O) : δ 5.71 (1H, dd, J=6.9 and 9.9 Hz), 5.02 (1H, d, J=50.3 Hz), 4.27-4.18 (1H, m), 3.88-3.71 (3H, m)

【0070】

合成例7：9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル)アデニン [式II; B=Adenine]

1. 0Mリン酸/トリ-n-ブチルアミンのアセトニトリル溶液(2.8mL, 2.8mmol)にモレキュラーシーブス4A(126mg)およびトリ-n-ブチルアミン(0.67mL, 2.8mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。室温でテトラ-n-ブチルアンモニウムヨージド(0.87g, 2.4mmol)を加え、さらに10分後、3,5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-プロミド[式II; R¹=Bz, X=Br](0.2g, 0.47mmol)のアセトニトリル溶液(2mL)を滴下した。

【0071】

室温で2時間攪拌した後、不溶物をろ過して除いた。ろ液を減圧下で濃縮し、残さを酢酸エチル(20mL)で抽出した。有機層を0.1N塩酸で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。

【0072】

残さをメチルエチルケトン(5mL)に溶解し、リン酸(0.74g)、モレキュラーシーブス4A(0.2g)を加え80℃で3時間攪拌した。不溶物をろ過して除去した後、溶媒を留去した。残さを酢酸エチル(20mL)で抽出した。有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去して粗3,5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート[式V; R¹=Bz, R²=H]を得た(HPLC分析: 1-リン酸誘導体56.4%, α/β =7.3)。

【0073】

これをメタノール(4mL)に溶解し、28%アンモニア水(2mL)を加え、室温で1時間攪拌した。さらに28%アンモニア水(2mL)を加え、室温で一晩攪拌した。減圧下で溶媒を留去し、残さを水(20mL)に溶解した。これを酢酸エチル(50mL)で2回洗浄し、水層を回収した。

【0074】

減圧下で水を濃縮し、残さを20mM リン酸カリウム緩衝液(20mL, pH 7.6)に溶解し、アデニン(54mg, 0.4mmol)およびプリンヌクレオシドホスホリラーゼ(粗酵素、1750ユニット)を加え、50℃で4日間静置した。反応液をメンブランろ過し(PTFE, 0.45mm)、ろ液を40mLの水溶液に調製後、逆相ODSカラムクロマトグラフィー(40mL, 0%~5%アセトニトリル-水)にて精製し、9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル)アデニン[式II; B=Adenine]を無色の結晶として50mg(対アデニン収率46%)を得た。

【0075】

¹H-NMR(DMSO-d₆): δ 8.26(1H, d, J=1.7Hz), 8.17(1H, s), 7.36(2H, brs), 6.41(1H, dd, J=4.6 and 14.1Hz), 6.15(1H, br), 5.25(1H, br), 5.22(1H, dt, J=4.3 and 52.7Hz), 4.47(1H, dt, J=4.5 and 19.4Hz), 3.86-3.84(1H, m), 3.68-3.63(2H, m)

【0076】

合成例8：9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル)アデニン[式II; B=Adenine]

リン酸(2.8g, 28.2mmol)、モレキュラーシーブス4A(2.0g)をアセトニトリル(10mL)に懸濁し、0℃でトリ-n-ブチルアミン(13.4mL, 56.4mmol)加え室温で1時間攪拌した。室温でテトラ-n-ブチルアンモニウムヨージド(8.7g, 23.5mmol)を加え、さらに10分後、3,5-O-ジベンゾイル-2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-プロミド[式III; R¹=Bz, X=Br](2.0g, 4.7mmol)のアセトニトリル溶液(20mL)を滴下した。

【0077】

室温で2時間攪拌した後、不溶物をろ過して除いた。ろ液を減圧下で濃縮し、残さを酢酸エチル（150mL）で抽出した。有機層を0.1N塩酸で3回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。

【0078】

残さをメチルエチルケトン（50mL）に溶解し、リン酸（7.4g）、モレキュラーシーブス4A（2.0g）を加え80℃で2時間攪拌した。不溶物をろ過して除去した後、溶媒を留去した。残さを酢酸エチル（150mL）で抽出した。有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を留去した（HPLC分析：1-リン酸誘導体67.4%， $\alpha/\beta = 3.1$ ）。

【0079】

これをメタノール（40mL）に溶解し、28%アンモニア水（20mL）を加え、室温で1時間攪拌した。さらに28%アンモニア水（20mL）を加え、室温で一晩攪拌した。減圧下で溶媒を留去し、残さを水（50mL）に溶解した。これを酢酸エチル（200mL）で2回洗浄し、水層を回収した。減圧下で水を濃縮し、粗2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート【式I】を調製した。

【0080】

この粗2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート【式I】の1/2量を20mM リン酸カリウム緩衝液（100mL, pH 7.6）に溶解し、アデニン（270mg, 2.0mmol）およびプリンヌクレオシドホスホリラーゼ（粗酵素、2000ユニット）を加え、50℃で6日間静置した。反応液をメンブランろ過し（PTFE, 0.45mm）、ろ液を150mLの水溶液に調製後、逆相ODSカラムクロマトグラフィー（200mL, 0%～5%アセトニトリル-水）にて精製し、9-（2-フルオロ- β -D-アラビノシル）アデニン【式II；B=Adenine】を無色の結晶として181mg（対アデニン収率34%）得た。

【0081】

¹H-NMR (DMSO-d₆) : δ 8.26 (1H, d, J=1.7Hz), 8.17 (1H, s), 7.36 (2H, brs), 6.41 (1H, dd, J=4.6 and 14.1Hz), 6.15 (1H, br), 5.25 (1H, br), 5.22 (1H, dt, J=4.3 and 5.2.7Hz), 4.47 (1H, dt, J=4.5 and 1.9.4Hz), 3.86-3.84 (1H, m), 3.68-3.63 (2H, m)

【0082】

合成例9：2, 6-ジアミノ-9-（2-フルオロ- β -D-アラビノシル）プリン【式II；B=2, 6-Diaminopurine】

実施例8で調製した粗2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート【式I】の1/2量を20mM リン酸カリウム緩衝液（100mL, pH 7.6）に溶解し、2, 6-ジアミノプリン（300mg, 2.0mmol）およびプリンヌクレオシドホスホリラーゼ（粗酵素、2000ユニット）を加え、50℃で6日間静置した。

【0083】

反応液をメンブランろ過し（PTFE, 0.45mm）、ろ液を150mLの水溶液に調製後、逆相ODSカラムクロマトグラフィー（200mL, 0%～3%アセトニトリル-水）にて精製し、2, 6-ジアミノ-9-（2-フルオロ- β -D-アラビノシル）プリン【式II；B=2, 6-Diaminopurine】を無色の結晶として228mg（対2, 6-ジアミノプリン収率40%）得た。

【0084】

¹H-NMR (DMSO-d₆) : δ 7.81 (1H, d, J=2.4Hz), 6.79 (2H, brs), 6.18 (1H, dd, J=4.2 and 16.5Hz), 5.89 (3H, brs), 5.20 (1H, br), 5.10 (1H, dt, J=3.7 and 5.2.6Hz), 4.39 (1H, ddd, J=3.7, 4.5 and 18.2Hz), 3.82-3.80 (1H, m), 3.79-3.60 (2H, m)

【0085】

合成例10：9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル) グアニン [式II；B=Guanine]

2, 6-ジアミノ-9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル) プリン (61. 2 mg, 0. 21 mmol) を 50 mM トリス塩酸緩衝液 (20 mL, pH 7. 0) に溶解し、アデノシンデアミナーゼ (71 ユニット) を加え、室温で 1. 5 時間攪拌した。

【0086】

反応液をメンブランろ過 (PTFE, 0. 5 μ m) し、60 mL 水溶液に調製した。これを逆相ODSカラムクロマトグラフィー (80 mL, 0-2%アセトニトリル-水) にて精製し、9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル) グアニン [式II；B=Guanine] を無色の結晶として 60. 4 mg (収率 100%) 得た。

【0087】

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆) : δ 10. 50 (1H, brs), 7. 80 (1H, s), 6. 54 (2H, brs), 6. 13 (1H, dd, J=4. 2 and 16. 0 Hz), 5. 94 (1H, d, J=4. 5 Hz), 5. 11 (1H, dt, J=3. 8 and 5. 2 Hz), 5. 08 (1H, t, J=5. 7 Hz), 4. 37 (1H, dd, J=3. 9 and 17. 8 Hz), 3. 82-3. 79 (1H, m), 3. 66-3. 57 (2H, m)

【0088】

合成例11：2-アミノ-6-クロロ-9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル) プリン [式II；B=2-Amino-6-chloropurine]

実施例6で調整した粗2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート [式I] (200 mg, 0. 5 mmol) を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (150 mL, pH 7. 5) に溶解し、2-アミノ-6-クロロプリン (170 mg, 1. 0 mmol) およびプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (粗酵素、3519 ユニット) を加え、50℃で 14 日間静置した。

【0089】

反応液をメンブランろ過し (PTFE, 0. 45 mm)、ろ液を 10 mL の水溶液に調整後、逆相ODSカラムクロマトグラフィー (20 mL, 0-5%アセトニトリル-水) にて精製し、2-アミノ-6-クロロ-9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル) プリン [式II；B=2-Amino-6-chloropurine]を得た。

【0090】

$^1\text{H-NMR}$ (D₂O) : δ 8. 20 (1H, s), 6. 31 (1H, dd, J=3. 9 and 17. 4 Hz), 5. 24 (1H, dt, J=3. 1 and 5. 1 Hz), 4. 56 (1H, dt, J=2. 2 and 18. 2 Hz), 4. 10-4. 07 (1H, m), 3. 92-3. 82 (2H, m)

【0091】

合成例12：2-アミノ-9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル) プリン [式II；B=2-Aminopurine]

実施例6で調整した粗2-フルオロ- α -D-アラビノシル-1-ホスフェート [式I] (200 mg, 0. 5 mmol) を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (50 mL, pH 7. 5) に溶解し、2-アミノプリン (135 mg, 1. 0 mmol) およびプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (粗酵素、1517 ユニット) を加え、50℃で 9 日間静置した。

【0092】

反応液をメンブランろ過し (PTFE, 0. 45 mm)、ろ液を 6 mL の水溶液に調整後、逆相ODSカラムクロマトグラフィー (40 mL, 0-5%アセトニトリル-水) にて精製し、2-アミノ-9-(2-フルオロ- β -D-アラビノシル) プリン [式II；B=2-Aminopurine] を 87. 3 mg (対2-アミノプリン収率 32%) 得た。

【0093】

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆) : δ 8. 63 (1H, s), 8. 18 (1H, d, J=2. 2 Hz), 6. 64 (2H, brs), 6. 50 (1H, br), 6. 31 (1H

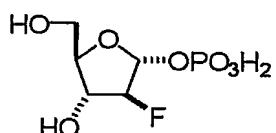
, d d, J = 4. 4 and 15. 2 Hz), 5. 19 (1H, d t, J = 4. 1 and 5. 2. 6 Hz), 5. 15 (1H, br), 4. 43 (1H, d dd, J = 4. 0, 4. 9 and 18. 3 Hz), 3. 85 (1H, q, J = 4. 9), 3. 70 - 3. 62 (2H, m)

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドおよびこれを鍵中間体とした2'-デオキシ-2'-フルオロー- β -D-アラビノヌクレオシドの製造法を提供することを目的とする。

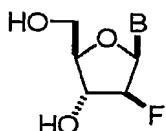
【解決手段】式(I)で示される α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシド又はその塩に関する。



(I)

【0001】

また、ヌクレオシドホスホリラーゼを用い、上記 α -1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドもしくは1-リン酸化2-デオキシ-2-フルオロアラビノシドの α β 混合物と塩基(B)から式(II)で示される2'-デオキシ-2'-フルオロー- β -D-アラビノヌクレオシドを合成することを特徴とする、2'-デオキシ-2'-フルオロー- β -D-アラビノヌクレオシドの製造法を提供する。



(II)

(式中、Bは塩基を示す。)

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-364013
受付番号	50301762904
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年10月27日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年10月24日
-------	-------------

特願 2003-364013

出願人履歴情報

識別番号 [000006770]

1. 変更年月日 1990年 8月 6日

[変更理由] 新規登録

住所 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1
氏名 ヤマサ醤油株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.